利用尿液蛋白质组学对阿托伐他汀进行药物一致性评价

赵晨阳 [1]，陈昱臻 [1]，付晓越 [1]，侯芙芳 [1]，高友鹤 [1]*
[1]（北京师范大学基因工程药物及生物技术北京市重点实验室 北京 100875）

摘要：

[目的] 通过尿液蛋白质组学分析对阿托伐他汀片进行药物一致性评价。

[方法] 分别建立两种药厂的阿托伐他汀片大鼠灌胃模型，收集灌胃前后的尿液，并使用液相色谱串联质谱技术（LC-MS/MS）对提取的尿蛋白进行分析，并通过 DAVID 数据库对差异蛋白进行生物学通路的分析。

[结果] 灌胃后和灌胃前作比较，在药物 A 组灌胃模型中共鉴定到 116 个差异蛋白，在药物 B 组灌胃模型中共鉴定到 66 个差异蛋白，其中有 24 个蛋白被共同鉴定到。这些差异蛋白倾向于参与细胞黏附、内肽酶活性的负调控、蛋白水解等生物学通路。

[结论] 针对产自不同药厂的阿托伐他汀片，我们可以通过尿蛋白检测到它们之间的差别，这验证了尿蛋白的灵敏性，同时提示着尿液蛋白质组学在药物一致性评价上有很大潜力。

关键词：尿液，蛋白质组学，药物一致性评价

Drug consistency evaluation of atorvastatin by urine proteomic

Chenyang Zhao[1] Yuzhen Chen[1] Xiaoyue Fu[1] Fufang Hou[1] Youhe Gao[1]*
[1](Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, Beijing Normal University, Beijing 100871, China)

Abstract:

[Objective] The drug consistency evaluation of atorvastatin by urine proteomic analysis.

[Methods] Intragastric administration rat models were established by atorvastatin from two companies. Urine samples were collected from rats before and after intragastric administration. Urine proteins were profiled using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), and the biological pathway of the differential proteins was analyzed by DAVID database.

[Results] The differential proteins were selected by comparing the after intragastric administration to before intragastric administration. A total of 116 differential proteins were identified in group A and 66 differential proteins in group B, and 24 proteins were identified in common between two groups. These differential proteins tend to be involved in biological pathways such as cell adhesion, negative regulation of endopeptidase activity and proteolysis.

[Conclusions] For two kind of atorvastatin, we can detect small differences in urinary protein between them, which confirms the sensitivity of urinary protein and suggests that urine proteomics has great potential for the Drug consistency evaluation.

Keywords: **urine; proteomics; drug consistency evaluation**

基金项目：国家重点研发计划课题（2018YFC0910202）；中央高校基本科研业务费专项资金（2020KJZX002）；北京师范大学（11100704）

作者简介：1.赵晨阳（1998.03—），女，硕士研究生，主要研究方向：尿液生物标志物；2. 陈昱臻（2001.07—），女，本科生；3.付晓越（2002.01—），女，本科；4.侯芙芳（2001.07—），女，本科生.
通信联系人：高友鹤（1964.06—），男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物.E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn.

1 引言

目前评价药物一致性采用的是化学和生物方法：化学方法是通过测定药物的溶出曲线等；生物方法多是对健康受试者进行药物的试用，通过空腹服药和采集静脉血，检测后对比相关指标得出被测药物是否具有一致性的结论。根据现有的药物一致性评价方法，我们产生了利用尿液蛋白生物标志物进行一致性评价的设计思路。生物标志物最基本的特征是"变化"，合适的生物标志物能够更早、更灵敏地反映身体变化。血液作为常用的检测样本，有着严格的稳态调控，其中大多数变化信息会被机体的调节机制清除，仅在相当短的时间内存在。相比之下，尿液是血液滤过的产物，不受体内稳态机制的严格调节，可以容纳并积累更多、更大的变化[1]，且尿蛋白可在较长时间内保持稳定[2]，尿液蛋白质组的复杂性相对较低，更容易检测到低丰度蛋白质的变化特征[3]，可见尿液是良好的生物标志物来源。由于尿液蛋白质组易受多种因素的影响，如饮食、药物治疗、日常活动等，要使实验结果更为准确，关键是采用简单且可控制的系统。由于动物模型的遗传和环境因素可以人为控制，能够最大程度减小无关的影响因素，因此采用动物模型是一种非常合适的实验方法。那么对于最广泛应用的他汀类降脂药，我们能否可以从尿液的角度对原研药和仿制药进行一致性评价呢？

他汀类药物是一种还原酶抑制剂（HMG-CoA），是临床上广泛使用的降血脂药物[4]。其降脂作用机制为竞争性抑制胆固醇合成的限速酶——羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶,从而降低细胞内的胆固醇水平；同时这一机制也可以上调患者肝细胞表面的低密度蛋白质的受体表达，从而对患者体内的血脂进行调节[5]。此外，他汀类药物还有除调脂以外的多种疗效，它的多效性在治疗动脉粥样硬化、冠心病、心房颤动、室性心律失常、抗心肌肥厚等方面发挥了重要作用[6]。本研究通过将合适剂量的两种阿托伐他汀片分别灌胃到大鼠，收集了大鼠灌胃前后的尿液并进行非标记定量蛋白质组学分析，探究了两种药物灌胃后的蛋白质组变化并进行比较，创新性地为药物一致性评价提供了新的评价方法。

2 材料与方法

2.1 灌胃动物模型的建立

健康 SD（SpragueDawley）雄性大鼠（160±20g），10 只，购于北京维通利华实验动物技术有限公司。大鼠在标准环境中（室温（22±1）℃，湿度 65%-70%）饲养三天后开始实验，一切实验操作遵循北京师范大学生命科学学院伦理委员会的审查和批准。

灌胃动物模型建立方法如下：采用自身前后对照的方式，将 10 只大鼠随机均分为 A、B 两组，A 组用 A 厂药物溶于生理盐水内进行灌胃操作，B 组用 B 厂药物溶于生理盐水内进行灌胃操作，A、B 两种药物剂型相同，剂量均为 10mg/kg，一天一次，持续 5 天，每天称取大鼠重量，按大鼠重量给与对应剂量的药品。

2.2 尿液样品的收集

给大鼠灌胃给药处理前统一将大鼠置于代谢笼中收集 12h 的尿液，然后在标准环境下饲养 3 天后进行灌胃给药，每天 1 次，连续 5 天，第 5 天灌胃给药处理后再将大鼠置于代谢笼中收集 12h 的尿液，在尿液收集过程中大鼠禁食禁水，两次收集的尿液都放入−80℃冰箱保存。

2.3 尿液样品的处理

尿蛋白提取和定量：将 2 个时间点收集到的大鼠尿液在 4℃的条件下以 12000×g 离心 40min，取上清液转移到新的 EP 管中，三倍上清体积加入预冷乙醇。均匀混合后在-20℃条件下沉淀过夜。第二天将乙醇上清混合液于 4℃，12000×g 离心 30min，弃上清，留蛋白沉

淀，倒扣于滤纸上，用吹风机冷风吹干；后将蛋白沉淀重悬于 120ul 裂解液中(8mol/L 尿素，2mol/L 硫脲，25mmol/L 二硫苏糖醇，50mmol/L Tris)，用枪头反复吹打，直到无沉淀为止，并于涡旋混合器完全混匀 2 小时。混合均匀后 4℃的条件下 12000×g 离心 30min，取上清蛋白置于新的 EP 管内，用 Bradford 法测量蛋白浓度。

尿蛋白酶切：取 100ug 尿蛋白样品加入到 10kDa 超滤管的滤膜(Pall, Port Washington, NY, USA)上，置于 1.5mL 离心管中，加入 25 mmol/L NH4HCO3 溶液使总体积为 200uL。后加入 20mM 二硫苏糖醇溶液（Dithiothreitol, DTT, Sigma），涡旋混匀后，金属浴 97℃加热 5min，冷却至室温。加入 50 mM 的碘乙酰胺（Iodoacetamide, IAA, Sigma），混匀后点甩一下，室温避光反应 40min。而后进行洗膜操作：①加入 200ul UA 溶液(8mol/L 尿素，0.1mol/L Tris-HCl，pH8.5)，按照 14000×g 5min 18℃的条件离心洗涤两次；②上样：加入刚刚处理的样品，在 14000×g 40min 18℃ 条件下进行离心；③加入 200uL UA 溶液，18℃条件下按 14000×g 离心 40min，重复两次；④加入 25 mmol/L NH4HCO3 溶液，在 14000×g 40min 18℃条件下离心，重复两次；⑤以胰酶：蛋白为 1：50 的比例加入胰蛋白酶（Trypsin Gold, Promega, Fitchburg, WI, USA）进行消化，37℃水浴过夜。最后通过 HLB 柱(Waters，Milford，MA)除盐，用真空干燥仪进行抽干，存入-80℃条件下保存。

2. 4 LC-MS/MS 串联质谱分析

酶解后的样品加入 0.1%的甲酸复溶，使用 BCA 试剂盒对肽段进行定量，将肽段浓度稀释为 0.5ug/uL。取每个样品 9ul 制备混合多肽样，按照说明书，使用高 pH 反相肽分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行分离。离心收集十份流出液（Fractions），使用真空干燥仪抽干后用 0.1%甲酸水复溶。以样品：iRT 为 10：1 的体积比例加入 iRT（Biognosis 公司）。每个样品（单个实验样品和十个 Fractions）取 1ug 使用 EASY-nLC1200 色谱系统(Thermo Fisher Scientific, USA)和 Orbitrap Fusion Lumos Tribrid 质谱仪(Thermo Fisher Scientific, USA)进行质谱分析并采集数据。

2. 5 数据处理

十个 Fractions 的 raw 文件通过 PD（Proteome Discoverer 2.1）软件进行分析，分析结果用于建立 DIA 采集方法。新建立的 DIA 方法用于进行单个样品的 DIA 模式采集。采集结束使用 Spectronaut X 软件对质谱数据进行处理和分析。导入每个样本 DIA 采集的 raw 文件进行搜库。采用二级肽段所有碎片离子峰面积进行蛋白定量。

2. 6 数据分析

采取自身对照的方式，将灌胃前后鉴定到的蛋白进行比较，进行差异蛋白的筛选。差异蛋白筛选条件为：组间变化倍数（Fold change）≥1.5 或≤0. 67，配对 t 检验分析的 P 值校正值＜0.05。对筛选到的差异蛋白使用 Uniprot 网站（https://www.uniprot.org/）和 DAVID 数据库（https://david.ncifcrf.gov/）进行生物学分析，并在 Pubmed 数据库上对已报道文献进行检索对差异蛋白进行功能分析。

3 结果与分析

3.1 实验动物的行为学分析

本研究中，在造模前后对 A、B 两组大鼠进行行为学观察，从行为学观察来看，两组大鼠活动正常，饮食饮水均正常，且两组大鼠相比，无明显的行为学差异。同时在灌胃给药处理前及给药处理 5 天时间里，两组大鼠体重均持续增加，生长状况正常，具体的体重变化见

图 1。

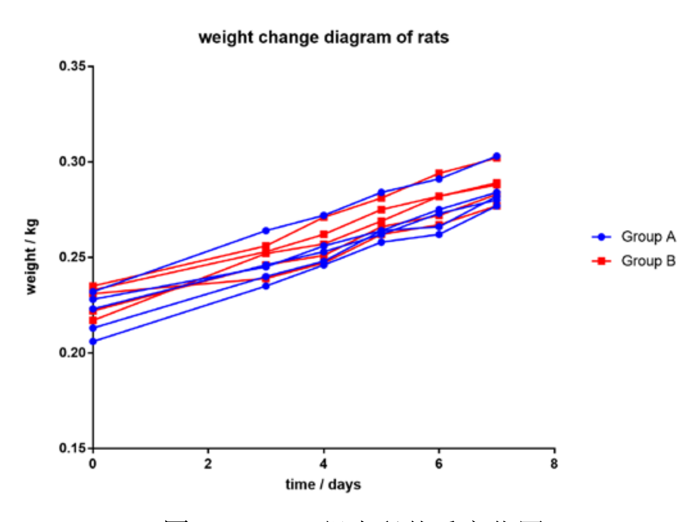


图 1　A、B 组大鼠体重变化图

Figure 1 Weight changes of rats in group A and group B.

3.2　尿液蛋白质组变化分析

（1）尿液蛋白质鉴定情况

在灌胃给药处理后，对所收集到的两组大鼠共 20 个尿液蛋白样品（灌胃前后）进行 LC-MS/MS 串联质谱分析。总共鉴定到 1261 个蛋白（特异性多肽≥2 个，蛋白水平 FDR<1%），对 A、B 两组大鼠灌胃后的尿液和灌胃前尿液进行比较，筛选差异蛋白的标准为：组间变化倍数 FC≥1.5 或≤0.67，双尾非配对 t 检验 P<0.05。结果表明，相对于灌胃给药前，灌胃给 A 药后鉴定到 116 个差异蛋白，灌胃给 B 药后鉴定到 66 个差异蛋白，差异蛋白的详细信息列于表 1（A 组）和表 2（B 组）。用韦恩图展示了 A、B 两种药物灌胃处理后鉴定到的差异蛋白的重叠情况（图 2），其中有 24 个蛋白在两组大鼠中均被鉴定到，同时我们对总蛋白进行了偏最小二乘法判别分析（PLS-DA），结果如图 3 所示。

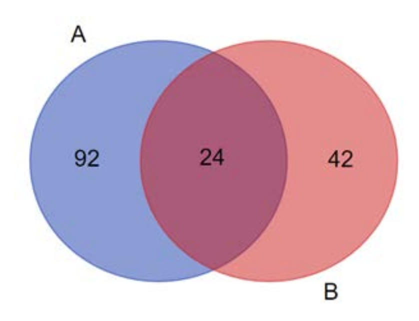


图 2　A、B 两组大鼠灌胃给药处理鉴定到的差异蛋白的韦恩图

Figure 2　The Venn diagram of differential proteins identified by intragastric administration of rats in group A and B.

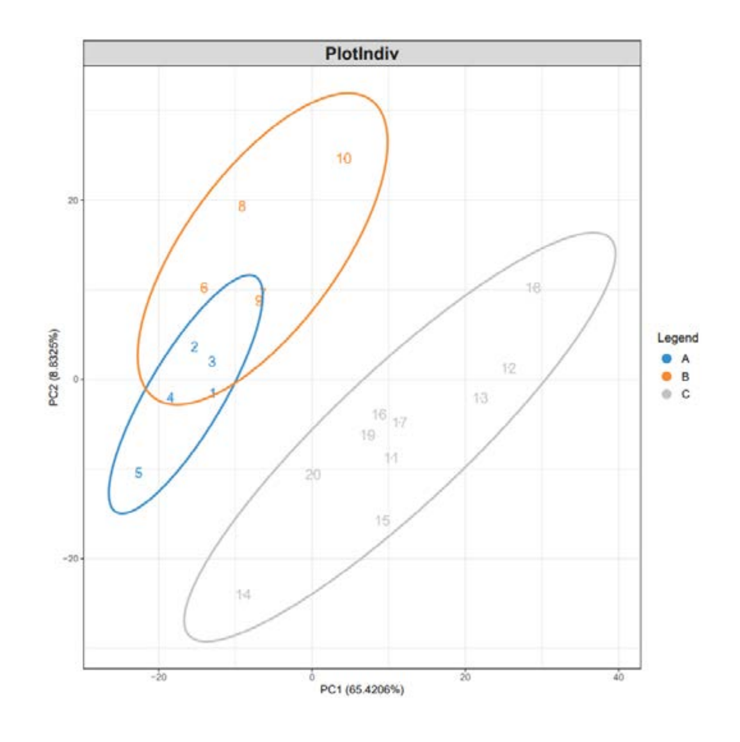


图 3 鉴定总蛋白偏最小二乘法判别分析结果

Figure 3 Partial least squares-discriminant analysis of the identified urine proteins.

（2）灌胃 A 组大鼠差异蛋白功能分析

使用 DAVID 数据库（https://david.ncifcrf.gov/）对灌胃 A 组大鼠鉴定到的差异蛋白从生物学过程、细胞成分和分子功能三个方面进行功能富集分析（图 3）。从图中可以看出，这些差异蛋白主要参与了细胞黏附、底物黏附依赖性细胞扩散、内肽酶活性的负调控、肽基酪氨酸磷酸化的正向调控、细胞迁移、蛋白水解等生物学过程。在细胞成分上，这些差异蛋白大多来自胞外和细胞质膜外，而在分子功能中，我们发现这些差异蛋白大多具有整合素结合、水解酶活性、丝氨酸型内肽酶抑制剂的活性、胰岛素样生长因子结合等功能。

（3）灌胃 B 组大鼠差异蛋白功能分析

同上，我们通过功能分析发现（图 4），灌胃 B 组大鼠鉴定到的差异蛋白主要参与了蛋白水解、肝细胞生长因子刺激的细胞反应、免疫反应、半胱氨酸代谢、甲状腺激素刺激的细胞反应、谷胱甘肽代谢等生物学过程。 在细胞成分上，这些差异蛋白仍旧是源于胞外区、分泌体；在分子功能中，差异蛋白主要具有肽酶活性、羧肽酶活性、水解酶活性、肽链内切酶抑制剂活性、谷氨酰半胱氨酸连接酶等功能。

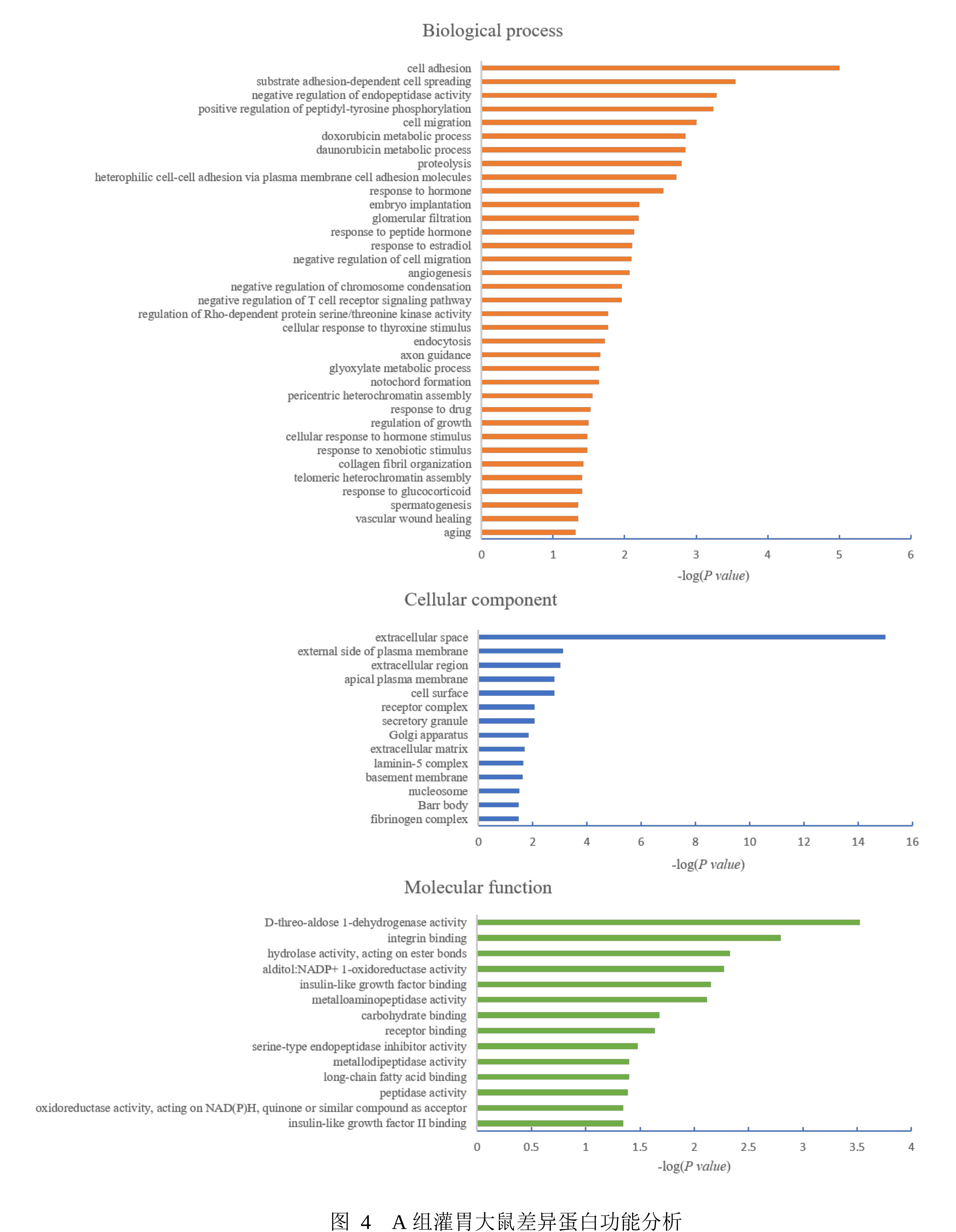


图 4　A 组灌胃大鼠差异蛋白功能分析

Figure 4　Functional analysis of differential proteins in group A.

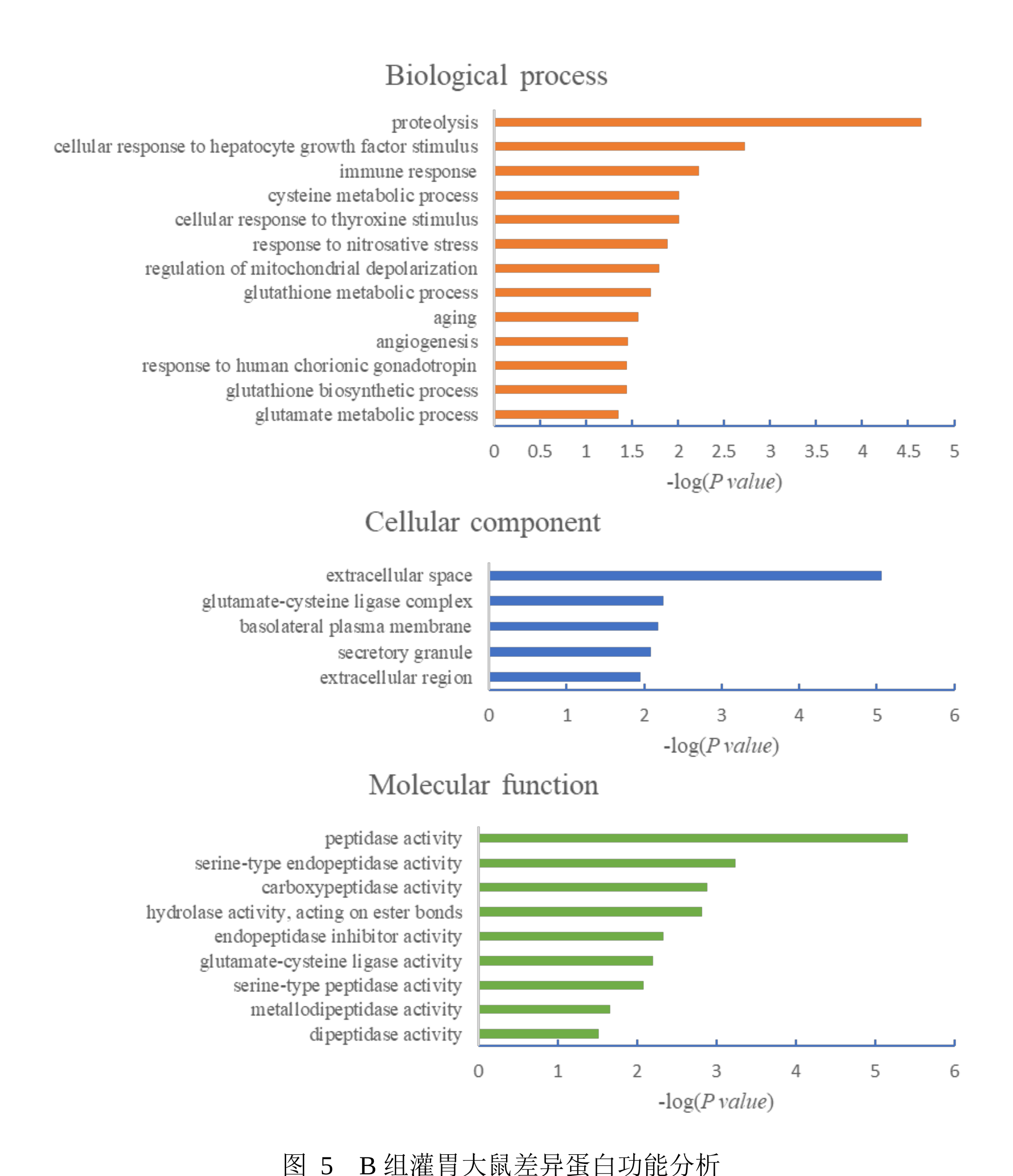


图 5　B 组灌胃大鼠差异蛋白功能分析

Figure 5　Functional analysis of differential proteins in group B.

4 讨论

本研究使用了源于两种药厂的阿托伐他汀片分别建立了大鼠灌胃模型，通过对灌胃前后收集的尿液进行非标记 LC-MS/MS 质谱鉴定和分析，探究不同药厂制药对大鼠尿蛋白的影响。统计分析结果显示，将灌胃后尿液和灌胃前尿液进行对比，在 A 组灌胃模型中共鉴定到 116 个差异蛋白，在 B 组灌胃模型中共鉴定到 66 个差异蛋白，其中有 24 个蛋白在两组中都被鉴定到。

根据偏最小二乘法判别分析结果我们可以发现，尿蛋白可以显示出阿托伐他汀对机体的显著影响，而不同厂家的两种成分、剂型、剂量一致的药物产生的影响也有差异能被观测到，这说明我们能从尿蛋白中看到很细致的变化。从差异蛋白的生物学功能分析结果上看，我们不能很明显的区分出这些影响源自于药物的药理作用还是毒理作用，首先我们没有观察到有显著的和降脂有关的生物学通路，其次如果有他汀类药物副作用的话，我们可能会看到和平

滑肌细胞迁移、血小板黏附下调相关的生物学通路[7]，而这些在本研究中并没有观测到。在目前的研究阶段来看，可能是因为剂量的问题让我们没有看到显著的药理或毒理作用，但在本研究中，即使是很小的剂量，我们依旧可以通过尿液来观测到机体受到的影响，这充分说明了尿液的灵敏性，以及其用来作为药物一致性评价方法的巨大潜力。

5 结论

通过建立阿托伐他汀大鼠灌胃模型，我们能从尿液上显著区分药物带来的影响；针对产自不同药厂的阿托伐他汀片，尿蛋白甚至可以检测到两种药物之间细致的差别，这充分验证了尿液的灵敏性，同时提示着尿液蛋白质组学在药物一致性评价上有很大潜力。

表 1　A 组鉴定到的尿液差异蛋白

Table 1　The differential proteins identified in group A.

Accession	Protein names	Fold change	Trend	P value
P42854	Regenerating islet-derived protein 3-gamma	24.39	↑	1.04E-02
P21708	Mitogen-activated protein kinase 3	5.29	↑	1.87E-02
M0R9A3	Uncharacterized protein	4.23	↑	2.40E-02
G3V8X9	Serine	3.82	↑	6.40E-03
D3ZJF8	Fc fragment of IgG-binding protein	3.61	↑	4.13E-02
D4A400	Lactoperoxidase	3.20	↑	2.66E-02
A0A1R3UCK1	Kallikrein k	3.15	↑	1.14E-02
M0R7L1	Lipase	3.08	↑	2.06E-02
D3ZUQ1	Lipase	2.90	↑	1.55E-02
Q66HG3	Beta-Ala-His dipeptidase	2.83	↑	1.97E-03
A0A0G2JXE0	Histone H2B	2.78	↑	1.94E-02
Q6IE55	Glandular kallikrein-10	2.60	↑	1.93E-02
Q4KLZ6	Triokinase/FMN cyclase	2.60	↑	1.95E-02
B0BMY8	Histone H3	2.59	↑	2.53E-02
A9UMV8	Histone H2A.J	2.59	↑	6.66E-03
F1M091	Kallikrein m	2.56	↑	2.77E-02
B0BN46	Glyoxylate and hydroxypyruvate reductase	2.38	↑	6.35E-03
M0R7T8	Similar to Vomeromodulin	2.35	↑	2.95E-02
P51635	Aldo-keto reductase family 1 member A1	2.31	↑	7.54E-03
Q9WUW9	Sulfotransferase 1C2A	2.21	↑	9.39E-03
A0A0G2K931	Phosphoserine aminotransferase	2.15	↑	9.72E-03
Q6VPP3	Chloride channel accessory 4	2.13	↑	3.28E-02
O88267	Acyl-coenzyme A thioesterase 1	2.11	↑	1.95E-02
Q5XIF6	Tubulin alpha-4A chain	2.06	↑	3.18E-02
Q641Z6	EH domain-containing protein 1	2.02	↑	4.57E-02
P48508	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	2.02	↑	4.75E-02
D3ZHD1	Annexin	2.00	↑	2.25E-02
B2RZ72	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	1.97	↑	4.17E-02
Q6P6V0	Glucose-6-phosphate isomerase	1.96	↑	4.12E-02
Q66HT1	Fructose-bisphosphate aldolase	1.92	↑	2.17E-02
P35446	Spondin-1	1.92	↑	1.13E-02
A0A0G2JYA4	Serine/threonine-protein phosphatase	1.90	↑	4.22E-02
F1LMP9	Disabled homolog 2	1.89	↑	2.87E-02
A0A0G2JV31	X-prolyl aminopeptidase	1.88	↑	2.65E-02
F1LU12	Similar to 20-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	1.86	↑	1.54E-03
D4AB20	Hexosyltransferase	1.85	↑	3.50E-02
P27867	Sorbitol dehydrogenase	1.84	↑	1.12E-02
D3ZS19	Alpha-2-macroglobulin-like 1	1.84	↑	4.45E-02
Q8CG45	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2	1.84	↑	4.38E-02
Q6Q0N1	Cytosolic non-specific dipeptidase	1.81	↑	2.22E-02

（续上表）

Accession	Protein names	Fold change	Trend	P value
P14408	Fumarate hydratase, mitochondrial	1.81	↑	3.68E-02
G3V6Y3	Kinesin-like protein	1.81	↑	1.54E-02
A0A0G2JT25	L-xylulose reductase	1.79	↑	2.00E-02
D4A5I9	Unconventional myosin-6	1.77	↑	1.88E-02
Q5XI89	NXPE family member 4	1.75	↑	3.90E-03
D3ZP47	14 kDa phosphohistidine phosphatase	1.73	↑	3.57E-02
D3ZH39	Receptor protein-tyrosine kinase	1.71	↑	2.93E-05
P30349	Leukotriene A-4 hydrolase	1.71	↑	3.82E-02
P35213	14-3-3 protein beta/alpha	1.68	↑	1.52E-02
Q5I0D7	Xaa-Pro dipeptidase	1.66	↑	3.35E-02
B5DER3	Isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog	1.65	↑	3.49E-02
Q5M8C6	Fibrinogen-like protein 1	1.64	↑	2.67E-02
O35142	Coatomer subunit beta'	1.63	↑	1.69E-03
D3ZAN3	Alpha glucosidase 2 alpha neutral subunit	1.61	↑	1.66E-02
P52759	2-iminobutanoate/2-iminopropanoate deaminase	1.59	↑	1.36E-02
A0A0G2K7Y7	Kinesin-like protein	1.59	↑	1.27E-03
P50137	Transketolase	1.58	↑	3.67E-02
A0A0F7RQL3	Macrophage migration inhibitory factor	1.57	↑	1.99E-02
Q63530	Phosphotriesterase-related protein	1.51	↑	1.75E-02
F1M7F7	Complement component C6	0.67	↓	4.45E-02
G3V6K1	Transcobalamin 2, isoform CRA_a	0.67	↓	1.12E-02
Q5FVP9	Cfh protein	0.67	↓	2.05E-02
Q63467	Trefoil factor 1	0.67	↓	1.80E-02
P08932	T-kininogen 2	0.66	↓	3.72E-02
G3V8G5	Golgi apparatus protein 1	0.66	↓	1.66E-02
A0A0G2K2W0	Protein-tyrosine-phosphatase	0.66	↓	3.95E-02
F1MAN8	Laminin subunit alpha 5	0.66	↓	3.78E-02
P97553	Ephrin-A1	0.66	↓	3.11E-03
D3ZZT9	Collagen type XIV alpha 1 chain	0.66	↓	1.09E-02
Q63691	Monocyte differentiation antigen CD14	0.66	↓	6.40E-03
Q62997	GDNF family receptor alpha-1	0.66	↓	4.47E-02
D3ZTM7	EF-hand calcium-binding domain 14	0.65	↓	4.51E-02
D4A5C0	Nectin cell adhesion molecule 3	0.65	↓	1.51E-03
P21704	Deoxyribonuclease-1	0.65	↓	4.08E-02
F7FHF3	Serpin family F member 2	0.65	↓	4.58E-02
F1M4J1	Dyslexia susceptibility 2-like	0.65	↓	7.72E-03
A0A0G2K135	Complement factor I	0.65	↓	4.98E-02
P07897	Aggrecan core protein	0.64	↓	4.44E-03
F1LZJ4	Putative hydroxypyruvate isomerase	0.64	↓	3.06E-04
P25236	Selenoprotein P	0.64	↓	4.73E-02

（续上表）

Accession	Protein names	Fold change	Trend	P value
B0BN41	RGD1565410 protein	0.64	↓	1.61E-02
Q5XIE8	Integral membrane protein 2B	0.64	↓	2.24E-03
F1M9B2	Insulin-like growth factor binding protein 7, isoform CRA_b	0.63	↓	1.14E-02
Q8CIN0	Receptor-like protein tyrosine phosphatase gamma S-type isoform	0.63	↓	1.47E-02
A0A0G2JU92	Embigin	0.63	↓	5.80E-03
A0A0G2JUT1	Cell adhesion molecule 1	0.63	↓	3.69E-02
D3ZPC4	Neural cell adhesion molecule L1	0.62	↓	2.29E-02
P57097	Tyrosine-protein kinase Mer	0.62	↓	4.09E-02
G3V964	Neurotrimin	0.61	↓	8.41E-03
A0A0G2K926	Murinoglobulin-1	0.61	↓	3.58E-02
A0A0G2K423	Growth hormone receptor	0.61	↓	6.13E-04
A0A0G2JSJ5	Anthrax toxin receptor 1	0.61	↓	1.35E-02
D3ZD19	Extracellular link domain-containing 1	0.61	↓	4.87E-03
A0A0G2K2L1	Podocalyxin	0.61	↓	9.28E-03
Q6AYE5	Out at first protein homolog	0.60	↓	5.22E-03
Q5GAM6	Angiogenin ribonuclease 1	0.59	↓	4.88E-02
G3V7K2	Leukemia inhibitory factor receptor	0.58	↓	3.16E-05
D3Z841	Butyrophilin-like 10	0.58	↓	2.05E-02
B1PLB1	CD34 antigen	0.57	↓	4.85E-03
F1LRH4	Laminin subunit gamma 2	0.57	↓	2.74E-02
Q9EPF2	Cell surface glycoprotein MUC18	0.57	↓	3.02E-03
Q9WVH8	Fibulin-5	0.56	↓	4.16E-02
G3V8V1	Granulin, isoform CRA_c	0.55	↓	1.24E-02
P01830	Thy-1 membrane glycoprotein	0.55	↓	2.68E-02
B5DEM1	Follicle stimulating hormone beta subunit	0.54	↓	3.72E-02
Q99PW7	Follistatin-related protein 3	0.54	↓	1.31E-02
P07483	Fatty acid-binding protein, heart	0.50	↓	6.09E-03
A0A0G2JXZ9	Protein-tyrosine-phosphatase	0.50	↓	9.91E-06
P12843	Insulin-like growth factor-binding protein 2	0.50	↓	1.48E-02
Q8VHC1	Cystatin E/M	0.48	↓	1.62E-03
P14480	Fibrinogen beta chain	0.48	↓	1.28E-02
D3ZRD9	Allograft inflammatory factor 1-like	0.47	↓	7.57E-03
B4F7A5	CD99 molecule	0.43	↓	4.00E-02
D4A3W2	Crumbs cell polarity complex component 2	0.39	↓	1.02E-03
P97574	Stanniocalcin-1	0.36	↓	4.30E-03
P21743	Insulin-like growth factor-binding protein 1	0.31	↓	9.24E-05

表 2 B 组鉴定到的尿液差异蛋白

Table 2 The differential proteins identified in group B.

Accession	Protein names	Fold change	Trend	P value
A9CMA3	Alpha-1,6-mannosyl-glycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	16.96	↑	7.25E-03
P42854	Regenerating islet-derived protein 3-gamma	5.74	↑	2.56E-02
M0RDL2	Ig-like domain-containing protein	5.48	↑	3.11E-02
G3V8J3	Chymotrypsin-like	4.71	↑	3.81E-02
B0BNN3	Carbonic anhydrase 1	3.51	↑	3.60E-02
D3ZFF8	Ig-like domain-containing protein	3.51	↑	4.78E-02
A0A142BM04	Anti-F4/80 kappa light chain variable region	3.39	↑	3.94E-02
D3ZDK4	Angiopoietin-like 7	3.12	↑	3.95E-02
A0A1R3UCK1	Kallikrein k	2.73	↑	2.59E-03
F1M091	Kallikrein m	2.68	↑	6.88E-03
Q6IE55	Glandular kallikrein-10	2.59	↑	2.46E-02
D3ZUQ1	Lipase	2.37	↑	8.50E-03
A0A0G2K9Z5	Ig-like domain-containing protein	2.20	↑	5.18E-03
M0R7L1	Lipase	2.13	↑	1.17E-02
Q9WUQ4	Secretory leukocyte protease inhibitor	2.09	↑	7.74E-03
D4A400	Lactoperoxidase	2.04	↑	3.86E-02
B5DFA0	Villin-1	1.99	↑	1.61E-03
A0A0G2JZN1	Ig-like domain-containing protein	1.98	↑	3.66E-02
P51635	Aldo-keto reductase family 1 member A1	1.96	↑	1.09E-02
Q66HG3	Beta-Ala-His dipeptidase	1.96	↑	2.40E-02
Q9WUW9	Sulfotransferase 1C2A	1.93	↑	2.22E-02
D4AB20	Hexosyltransferase	1.88	↑	9.57E-04
A0A0G2K1U8	Chymotrypsin-C	1.87	↑	1.02E-02
P01041	Cystatin-B	1.81	↑	9.08E-04
M0R7T8	Similar to Vomeromodulin	1.80	↑	4.28E-02
Q66HT1	Fructose-bisphosphate aldolase	1.78	↑	2.81E-02
A0A0G2JSV5	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	1.76	↑	1.36E-02
D3ZQR5	Ig-like domain-containing protein	1.76	↑	3.04E-03
O08557	N	1.75	↑	9.94E-03
Q63530	Phosphotriesterase-related protein	1.71	↑	1.07E-02
B6DYQ5	Glutathione S-transferase omega	1.71	↑	1.40E-02
Q6Q0N1	Cytosolic non-specific dipeptidase	1.71	↑	1.54E-02
A0N4E8	Productively rearranged V-lambda-2	1.67	↑	3.83E-02
P19468	Glutamate--cysteine ligase catalytic subunit	1.67	↑	4.67E-02
D3ZHD1	Annexin	1.67	↑	1.73E-02
D3ZUX1	Hydroxylysine kinase	1.65	↑	1.99E-02
Q6MG61	Chloride intracellular channel protein 1	1.63	↑	1.41E-03
Q6AYQ9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1.63	↑	3.13E-02
A0A0H2UHA7	Solute carrier family 15	1.62	↑	1.81E-02
Q68FS4	Cytosol aminopeptidase	1.62	↑	2.62E-02

（续上表）

Accession	Protein names	Fold change	Trend	P value
Q5PPH0	Enolase-phosphatase E1	1.62	↑	4.61E-02
P48508	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	1.61	↑	3.38E-02
G3V8C4	Chloride intracellular channel protein	1.61	↑	3.64E-02
E9PTY1	Opiorphin prepropeptide	1.60	↑	1.49E-02
Q6AYS7	Aminoacylase-1A	1.59	↑	2.86E-02
F1LRH8	Solute carrier organic anion transporter family member	1.59	↑	2.93E-02
P46720	Solute carrier organic anion transporter family member 1A1	1.57	↑	4.62E-02
P54759	Ephrin type-A receptor 7	1.55	↑	4.33E-02
D3ZP47	14 kDa phosphohistidine phosphatase	1.54	↑	4.99E-02
Q9JJ40	Na	1.54	↑	4.20E-02
Q8R431	Monoglyceride lipase	1.54	↑	4.54E-02
Q6IN11	CCN family member 2	1.53	↑	4.66E-02
Q5M7T9	Threonine synthase-like 2	1.53	↑	1.51E-02
Q3T1J1	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	1.51	↑	4.67E-02
Q91YB6	Complement inhibitory factor H	0.66	↓	2.62E-03
D3ZCG9	Integrin alpha 3 variant A	0.66	↓	4.16E-02
A0A0G2JXZ9	Protein-tyrosine-phosphatase	0.65	↓	2.03E-02
Q62609	Noelin	0.65	↓	1.80E-02
F1LZJ4	Putative hydroxypyruvate isomerase	0.63	↓	3.90E-02
A0A0G2JU92	Embigin	0.63	↓	9.36E-03
D3ZWD6	Complement C8 alpha chain	0.61	↓	2.48E-02
B4F7A5	CD99 molecule	0.60	↓	2.13E-02
Q8CG43	MASP-3 protein	0.59	↓	4.54E-02
A0A0A0MXV3	Cell growth regulator with EF hand domain 1, isoform CRA_b	0.56	↓	2.85E-02
P21743	Insulin-like growth factor-binding protein 1	0.50	↓	2.58E-02
D3ZRD9	Allograft inflammatory factor 1-like	0.46	↓	1.77E-02

参考文献：

1. Gao, Y., Urine-an untapped goldmine for biomarker discovery? Science China. Life sciences, 2013. 56(12): p. 1145-1146.
2. Good, D.M., et al., Body fluid proteomics for biomarker discovery: lessons from the past hold the key to success in the future. J Proteome Res, 2007. 6(12): p. 4549-55.
3. Paul, P., et al., Bioinformatics for Renal and Urinary Proteomics: Call for Aggrandization. Int J Mol Sci, 2020. 21(3).
4. 赵娜,石靖.他汀类药物质量一致性评价的技术要求探讨[J].中国医药工业杂志,2021,52(03):400-406.DOI:10.16522/j.cnki.cjph.2021.03.017..
5. 张冰,王莉莉. [J].国际药学研究杂志,2013,40(05):560-564+572.
6. 沈雁岩,张延勋.他汀类药物多效性在心血管疾病中应用的研究进展[J].医学综述,2012,18(16):2612-2616.
7. Wei, J., et al., Dynamic urine proteome changes in a rat model of simvastatin-induced skeletal muscle injury. J Proteomics, 2022. 254: p. 104477.

作者贡献声明 ：

高友鹤：提出研究思路，设计研究方案；

赵晨阳、陈昱臻、付晓越、侯芙芳：进行实验、论文起草

赵晨阳：采集、分析、处理数据；

高友鹤：论文最终版本修订。